

Journal of Chromatography, 272 (1983) 299–305

Biomedical Applications

Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 1505

DOSAGE PLASMATIQUE ET URINAIRE DU 3,3,5-TRIMÉTHYLCYCLOHEXANOL-*cis* LIBRE ET CONJUGUÉ

G. ANDERMANN* et M. DIETZ

Laboratoires P.O.S., Service de Recherches Biopharmaceutiques, F-68240 Kaysersberg (France)

(Reçu le 11 juin 1982; manuscrit modifié reçu le 9 septembre 1982)

SUMMARY

Determination of free and conjugated cis-3,3,5-trimethylcyclohexanol in plasma and urine

A gas chromatographic procedure was developed to determine free and conjugated *cis*-3,3,5-trimethylcyclohexanol in plasma and urine.

The sample is extracted with dichloromethane when free *cis*-3,3,5-trimethylcyclohexanol is determined, or with hexane after enzymatic hydrolysis, when conjugated *cis*-3,3,5-trimethylcyclohexanol is determined. An aliquot of the organic extract is injected into a stainless-steel column (packed with Carbowax 20M, 15% on Chromosorb W AW 100–120 mesh) and detected with a flame ionization detector. Extraction recovery from plasma and urine was almost 100% and the limit of quantification was fixed at 100 ng/ml plasma or urine.

The procedure was evaluated in a pharmacokinetic study of cyclandelate and its metabolite *cis*-3,3,5-trimethylcyclohexanol.

INTRODUCTION

Le cyclandélate ou 3,3,5-triméthylcyclohexylmandélate est un vasodilatateur périphérique largement répandu en thérapeutique [1–5]. Au cours d'études portant sur la pharmacocinétique et le métabolisme de ce principe actif, une biotransformation rapide de l'ester a été mise en évidence, libérant dans l'organisme deux métabolites: l'acide mandélique et le 3,3,5-triméthylcyclohexanol-*cis* selon la Fig. 1. Dans une précédente publication [6], nous avons décrit le dosage plasmatique de la drogue active et d'un de ses métabolites: l'acide mandélique.

Le travail qui suit décrit la détermination quantitative de l'autre métabolite, le 3,3,5-triméthylcyclohexanol-*cis* libre et conjugué, dans le plasma et l'urine

puis transvasée dans un tube à fond conique. L'évaporation se poursuit à froid jusqu'à 50 μ l sous un flux constant d'azote. 1 μ l de cette solution est injecté sur la colonne chromatographique.

3,3,5-Triméthylcyclohexanol-cis total urinaire. Le protocole décrit précédemment pour le dosage de la forme libre a été adapté au problème de l'hydrolyse enzymatique; 2 ml de solution de β -glucuronidase à environ 250 unités Fishman/ml de tampon pH 4.7, sont rajoutés à 0.1 ml d'urine et placés à l'étuve à 37°C pendant 72 h. Au bout de ce temps, 0.5 ml de la solution de cyclohexanol à 40 mg/100 ml d'eau purifiée sont ajoutés puis la solution enzymatique transférée dans un ballon de distillation. Le tube est rincé avec 18 ml d'eau purifiée et les eaux de rinçage rajoutées dans le ballon. 10 ml de la solution aqueuse sont distillés; ils contiennent le 3,3,5-triméthylcyclohexanol-cis total et le cyclohexanol. 1 ml de distillat est repris dans un tube à centrifuger de 15 ml, agité pendant 2 min avec 10 ml d'hexane puis centrifugé pendant 10 min à 40,000 g et 5°C. La phase hexane surnageante est récupérée dans un ballon, évaporée partiellement (environ 1 ml) sous vide à l'évaporateur rotatif, transvasée dans un flacon à fond conique puis évaporée jusqu'à 50 μ l sous un flux d'azote. 1 μ l de cette solution est injectée dans le chromatographe en phase gazeuse.

Méthode de quantification

Les aires des pics du 3,3,5-triméthylcyclohexanol-cis (I) et du cyclohexanol (II) sont fournies par l'intégrateur Sigma 10B, et les rapports sont calculés par division respective des aires de (I) par celles de (II).

Une droite d'étalonnage dans le plasma et l'urine pour des concentrations croissantes de (I), en présence de (II), est effectuée selon la méthodologie décrite; après son analyse selon le principe de la régression linéaire des moindres carrés, elle fournit une équation qui servira ultérieurement lors de l'évaluation d'échantillons inconnus.

L'évaluation quantitative du 3,3,5-triméthylcyclohexanol-cis total s'effectue selon le même principe, mais au moyen d'une gamme étalon [entre 1 et 100 μ g de (I)], réalisée pour chaque série d'extractions, afin d'éliminer toutes les erreurs introduites par une distillation peu reproductible jour après jour. Les concentrations en 3,3,5-triméthylcyclohexanol-cis conjugué sont déduites par simple soustraction entre les concentrations de formes totales et libres.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Analyse du 3,3,5-triméthylcyclohexanol-cis libre plasmatique ou urinaire

Chromatogramme. L'analyse en chromatographie en phase gazeuse d'un plasma ou urine vierge est présentée en Fig. 2A. La Fig. 2B montre le 3,3,5-triméthylcyclohexanol-cis (I) et le cyclohexanol (II) (étalon interne) après leur addition et extraction suivant la méthodologie d'extraction de la forme libre décrite précédemment. Les temps de rétention sont respectivement de 9.94 et 6.96 min pour I et II.

Fonction d'étalonnage. La linéarité de la méthode a été étudiée pour des quantités croissantes (0.1-40 μ g) de 3,3,5-triméthylcyclohexanol-cis rajoutés au plasma ou à l'urine. Le cyclohexanol (étalon interne) se trouve dans tous les

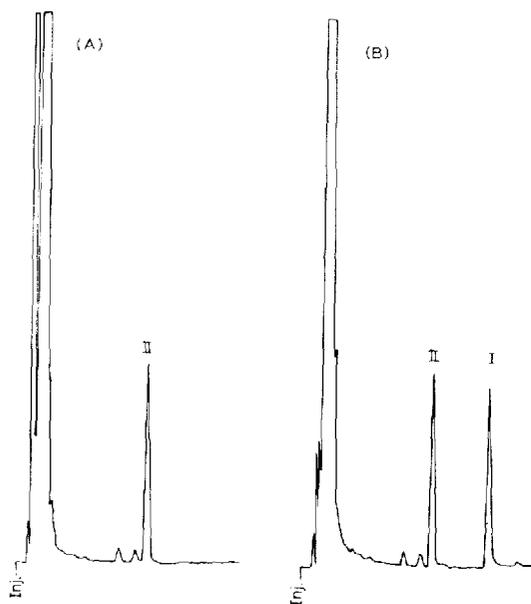


Fig. 2. Chromatogrammes d'un extrait plasmatique. (A) Plasma vierge en présence de 20 μg de cyclohexanol (II) (étalon interne). (B) Plasma + 20 μg de 3,3,5-triméthylcyclohexanol-*cis* (I) et 20 μg de cyclohexanol (II). Temps de rétention: 9,94 min pour I et 6,96 min pour II.

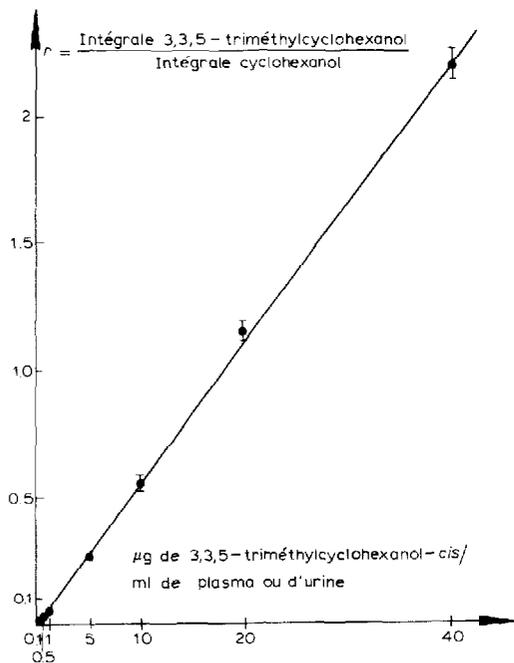


Fig. 3. Droite d'étalonnage du 3,3,5-triméthylcyclohexanol-*cis* dans le plasma ou l'urine après extraction par le dichlorométhane.

échantillons à la concentration de 20 $\mu\text{g/ml}$ de plasma ou d'urine. La droite de calibration (Fig. 3) obtenue est linéaire dans la gamme de concentration choisie comme l'indique le coefficient de corrélation r entre la quantité de μg de 3,3,5-triméthylcyclohexanol-*cis* rajoutée et le rapport des intégrales 3,3,5-triméthylcyclohexanol-*cis*/cyclohexanol.

La droite de régression a pour équation:

$$Y = 0.0556X + 0.00005; r = 0.9993$$

où $X = \mu\text{g}$ de 3,3,5-triméthylcyclohexanol-*cis* libre/ml de plasma ou d'urine, et $Y =$ rapport des intégrales 3,3,5-triméthylcyclohexanol-*cis*/cyclohexanol.

Précision

L'extraction, pour les différentes concentrations de 3,3,5-triméthylcyclohexanol-*cis* a été réalisée pendant 6 jours consécutifs. Les résultats obtenus (Tableau I) démontrent une bonne reproductibilité interjournalière, les coefficients de variation se situant entre 2.5% (40 $\mu\text{g/ml}$) et 7.7% (0.5 $\mu\text{g/ml}$). Seule la concentration minimale (0.1 $\mu\text{g/ml}$) présente un coefficient de variation important: 20%.

TABLEAU I

RAPPORT DES INTÉGRALES 3,3,5-TRIMÉTHYLCYCLOHEXANOL-*cis* LIBRE/CYCLOHEXANOL EN FONCTION DE LA QUANTITÉ DE 3,3,5-TRIMÉTHYLCYCLOHEXANOL-*cis* (EN $\mu\text{g/ml}$ DE PLASMA OU URINE) APRÈS EXTRACTION DANS LE DICHLOROMÉTHANE

$\mu\text{g/ml}$	Essais						$\bar{x} \pm \sigma$	C.V. (%)
	1	2	3	4	5	6		
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000 \pm 0.000	0
0.1	0.005	0.006	0.004	0.005	0.003	0.006	0.005 \pm 0.001	20
0.5	0.029	0.028	0.026	0.028	0.024	0.023	0.026 \pm 0.002	7.7
1	0.047	0.050	0.051	0.048	0.053	0.049	0.050 \pm 0.002	4.0
5	0.263	0.261	0.274	0.258	0.261	0.283	0.267 \pm 0.010	3.8
10	0.587	0.591	0.567	0.523	0.524	0.552	0.557 \pm 0.030	5.4
20	1.173	1.161	1.138	1.196	1.119	1.099	1.148 \pm 0.036	3.1
40	2.189	2.124	2.289	2.234	2.208	2.210	2.209 \pm 0.054	2.5

Rendement

La détermination du rendement de l'extraction est obtenue en comparant la droite de calibration obtenue avec des prélèvements plasmatiques ou urinaires à celle d'une gamme étalon de 3,3,5-triméthylcyclohexanol-*cis* étalon dans le dichlorométhane. La droite de régression: $Y = 0.0555X - 0.0059$ obtenue au cours de ces essais est en tout point comparable à celle obtenue après extraction. Le rendement de l'extraction peut ainsi être évalué à près de 100%.

Limite de dosage

La limite de dosage, déterminée avec une probabilité de $p = 0.05$ est de 100 ng/ml de plasma ou d'urine.

Analyse du 3,3,5-triméthylcyclohexanol-cis total

Chromatogramme. L'analyse chromatographique d'un échantillon d'urine de lapin obtenue après administration orale de 500 mg/kg de cyclandélate est présentée en Fig. 4. Les temps de rétention sont identiques à ceux obtenus lors du passage de la forme libre de l'alcool.

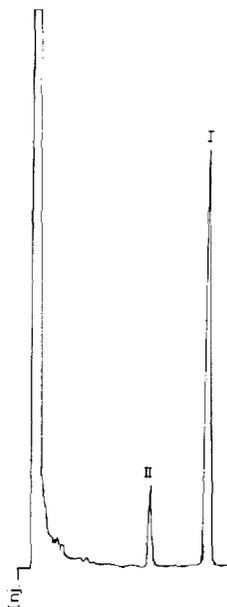


Fig. 4. Chromatogramme d'un échantillon d'urine de lapin après administration orale de 500 mg/kg de cyclandélate. Détermination du 3,3,5-triméthylcyclohexanol-cis total (I). Temps de rétention: 9.94 min pour I et 6.96 min pour cyclohexanol (II).

CONCLUSION

La méthode décrite est linéaire sur une gamme assez large (0.1–40 $\mu\text{l/ml}$ plasma ou urine dans le cas de la forme libre, 1–100 $\mu\text{g/ml}$ plasma ou urine pour la forme totale), précise, sensible et ceci malgré un protocole relativement laborieux et long d'exécution.

Elle a trouvé une application dans l'étude de pharmacocinétique et de métabolisme du cyclandélate administré au lapin par voie intraveineuse ou par voie orale.

Les concentrations plasmatiques et urinaires en 3,3,5-triméthylcyclohexanol-cis libre et conjugué ont été déterminées et la biotransformation de l'ester (cyclandélate) évaluée en fonction du temps.

Les résultats obtenus au cours de ce travail feront l'objet d'une autre publication.

RÉSUMÉ

Nous avons développé une méthode de dosage du 3,3,5-triméthylcyclohexanol-*cis* libre et conjugué dans le plasma et l'urine par chromatographie en phase gazeuse.

L'échantillon est extrait avec le dichlorométhane lors de la détermination du 3,3,5-triméthylcyclohexanol-*cis* libre ou avec l'hexane après hydrolyse enzymatique lors de l'analyse du 3,3,5-triméthylcyclohexanol-*cis* conjugué, injecté dans une colonne en acier inoxydable (Carbowax 20M à 15% sur Chromosorb W AW 100-120 mesh) et détecté au moyen d'un détecteur à ionisation de flamme. Le rendement de l'extraction à partir du plasma et de l'urine a été de près de 100%, et la limite de dosage fixée à 100 ng/ml de plasma ou d'urine.

La méthode a été évaluée dans le cadre d'une étude pharmacocinétique du cyclandélate et de son métabolite le 3,3,5-triméthylcyclohexanol-*cis*.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 O. Algan et H. Kienle, *Med. Welt*, 9 (1969) 471.
- 2 J.A.C. Ball et A.R. Taylor, *Brit. Med. J.*, 3 (1967) 525.
- 3 U.G. Bijlsma, A.B.H. Funcke, H.M. Terstege, R.F. Rekker, M.J.E. Ernsting et W.Th. Nauta, *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 105 (1956) 145.
- 4 M.D. O'Brien et N. Veall, *Lancet*, i (1966) 729.
- 5 O. Eichhorn, *Vasc. Dis.*, 2 (1965) 305.
- 6 G. Andermann et M. Dietz, *J. Chromatogr.*, 223 (1981) 365.